

KONINKRIJK DER



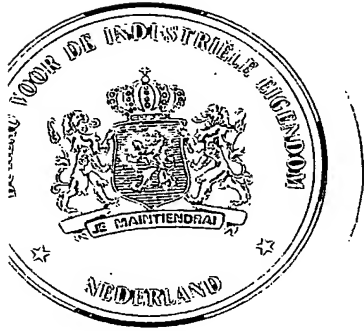
NEDERLANDEN

Bureau voor de Industriële Eigendom

REC'D 14 MAY 2003

WIPO

PCT



Hierbij wordt verklaard, dat in Nederland op 17 april 2002 onder nummer 1020415,  
ten name van:

**NEDERLANDSE ORGANISATIE VOOR TOEGEPAST-  
NATUURWETENSCHAPPELIJK ONDERZOEK TNO**  
te Delft

een aanvraag om octrooi werd ingediend voor:

"Procescontrole gebaseerd op microbiologische activiteit",

en dat de hieraan gehechte stukken overeenstemmen met de oorspronkelijk ingediende stukken.

Rijswijk, 24 april 2003

De Directeur van het Bureau voor de Industriële Eigendom,  
voor deze,

Mw. I.W. Scheevelenbos-de Reus

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

## UITTREKSEL

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op het bepalen van omgevingscondities ten behoeve van procescontrole met behulp van micro-organismen. De onderhavige uitvinding maakt gebruik van het principe dat intrinsieke veranderingen in een micro-organisme na het toedienen van een uitwendige prikkel karakteristiek zijn voor de aard van de prikkel die het micro-organisme van buitenaf ontvangt. Door deze intrinsieke veranderingen te meten kunnen micro-organismen worden gebruikt als een specifieke sensor om omgevingscondities te bepalen, om de mate van verandering in deze omgevingsconditie te bepalen, om de aard en hoogte van de prikkel vast te stellen en om de effecten van uiteenlopende prikkels op diverse processen te kunnen meten en daarmee deze processen te beheersen.

P59417NL00

Titel: Procescontrole gebaseerd op microbiologische activiteit

De uitvinding heeft betrekking op het bepalen van omgevingscondities. In het bijzonder heeft de onderhavige uitvinding betrekking op bepalen van omgevingscondities ten behoeve van procescontrole met behulp van micro-organismen.

5 Vele industriële en natuurlijke processen, bijvoorbeeld de bereiding en verpakking van voedsel, zijn niet goed te beheersen omdat de heersende procescondities niet gemakkelijk zijn te bepalen. Als gevolg van die afwezigheid van kennis omtrent de heersende procescondities is sturing daarvan erg moeilijk en meestal inefficiënt.

10 In veel gevallen worden de processen door al dan niet gewenste aanwezigheid van micro-organismen bepaald of in sterke mate beïnvloed. Voorbeelden van dergelijke processen zijn voedselbereidingsprocessen, voedselverpakking, biofilmvormingsprocessen, fermentatieprocessen en bioconversieprocessen.

15 Beheersing van de activiteit van de micro-organismen die bij deze processen een rol spelen, zoals het afdoden van ongewenste micro-organismen of juist het stimuleren van de activiteit van gewenste organismen, is vaak problematisch. De doeltreffendheid van het proces van afdoding van ongewenste micro-organismen geschiedt bijvoorbeeld  
20 traditioneel door het achteraf vaststellen van het aantal nog overlevende micro-organismen.

De specifieke biologische reactie van het doelorganisme wordt in de bovenomschreven procesvoorbeelden en in vele andere processen niet rechtstreeks geanalyseerd. Hierdoor is efficiënt en effectief controleren van  
25 bovenbedoelde processen vaak niet goed mogelijk.

Het controleren of monitoren van omgevingscondities, zoals (barometrische) druk, temperatuur, chemisch stofconcentratie, vochtgehalte

en/of luchtvochtigheid, zuurgraad, lichtregime, geluid en straling in het ons omringende milieu alsook in bepaalde werkruimten zoals clean-room faciliteiten, operatiekamers, ruimten voor analytische metingen, opslagruimten voor chemische stoffen, e.d. is zeer gewenst. Vanuit het oogpunt van veiligheid is het controleren of monitoren van 5 gezondheidsbedreigende chemische of biologische stoffen in het ons omringende milieu, waaronder de ons omringende lucht, watermassa's, grond en voeding, gewenst. Door de onbekendheid van de toxische componenten zelf of vanwege het feit dat alleen specifieke combinaties 10 ongewenst zijn is het meten van dergelijke stoffen in veel gevallen problematisch, zometeen onmogelijk. Het beschikbaar komen van verbeterde mogelijkheden voor het controleren of monitoren van omgevingscondities is dan ook eveneens gewenst.

Met de term omgevingsconditie wordt hierin in brede zin de 15 fysische en/of chemische toestand van de omgeving bedoeld. Meer specifiek betreft het in dit verband de aanwezigheid van specifieke chemische stoffen in de omgeving.

Tegenwoordig is een grote verscheidenheid aan omgevingscondities eenvoudig te meten met speciaal daarvoor ontwikkelde instrumenten. Ook 20 specifieke biosensoren voor het meten van een aantal chemische verbindingen zijn beschikbaar. Vele chemische verbindingen zijn echter niet of niet gemakkelijk meetbaar.

Het is nu verrassenderwijs gevonden dat micro-organismen als meetinstrument kunnen worden gebruikt omdat ze op een dergelijke wijze 25 op hun omgeving reageren dat daaruit een omgevingsconditie valt te herleiden.

De onderhavige uitvinding voorziet in een werkwijze voor het bepalen van een omgevingsconditie door het meten van een biochemische compositie van één of meer micro-organismen die zijn blootgesteld aan 30 genoemde omgevingsconditie.

De onderhavige uitvinding voorziet tevens in een werkwijze voor het bepalen van veranderingen in een omgevingsconditie door het meten van veranderingen in een biochemische compositie van één of meer micro-organismen die zijn blootgesteld aan genoemde veranderingen in een omgevingsconditie.

Verder voorziet de onderhavige uitvinding in een werkwijze voor het bepalen van een omgevingsconditie omvattende het meten van een biochemische compositie van één of meer micro-organismen die zijn blootgesteld aan genoemde omgevingsconditie, het afzetten van genoemde biochemische compositie tegen een tevoren bepaalde ijklijn van een meervoudigheid van biochemische composities van genoemde één of meer micro-organismen verkregen middels blootstelling van genoemde één of meer micro-organismen aan een meervoudigheid van omgevingscondities en het bepalen van genoemde omgevingsconditie aan de hand van de positie van genoemde biochemische compositie op genoemde ijklijn.

Met de verbeterde werkwijze kunnen processen worden gecontroleerd en beheerst op basis van de intrinsieke veranderingen in micro-organismen, al dan niet reeds aanwezig in een proces of in een (proces)omgeving, of daarin geïntroduceerd met het doel om een omgevingsconditie te bepalen middels een werkwijze volgens de onderhavige uitvinding.

De verbeterde werkwijze voorziet in de mogelijkheid om zeer kleine veranderingen in de omgeving te meten welke voorheen niet meetbaar waren.

De onderhavige uitvinding maakt gebruik van het principe dat een micro-organisme in sterke mate op invloeden van buitenaf reageert. De intrinsieke veranderingen in het micro-organisme na het toedienen van een uitwendige prikkel bestaan uit veranderingen in hoeveelheden en aard van biomoleculen als RNA, eiwit en metaboliëten. Het is nu gevonden dat het totaal van dergelijke veranderingen karakteristiek is voor de aard van de

prikkels die het micro-organisme van buitenaf ontvangt. Door onder diverse omstandigheden concentraties van deze biomoleculen in de micro-organismen te meten en te vergelijken kunnen voorts groepen van biomoleculen geselecteerd worden die specifiek veranderen als gevolg van een reactie van het micro-organisme onder invloed van een specifieke prikkel of omgevingsconditie.

Op deze wijze kunnen micro-organismen worden gebruikt als een specifieke sensor om omgevingscondities te bepalen, om de mate van verandering in deze omgevingsconditie te bepalen, om de aard en hoogte van de prikkel vast te stellen en om de effecten van uiteenlopende prikkels op diverse processen te kunnen meten en daarmee deze processen te beheersen.

Voorbeelden van een dergelijk werkwijze omvatten onder andere:

- het bepalen van effecten van temperatuur, of van op temperatuur gebaseerde conserveringsmethoden, op de groei en/of de afsterving van micro-organismen;
- onderzoek naar de aard van veranderingen in proceskarakteristieken op de productiviteit van micro-organismen;
- microbiële afbraak van ongewenste toxische stoffen (biodegradatie);
- testen effectiviteit anti-microbiële stoffen op ongewenste groei van micro-organismen;
- testen effect van verschillende materialen op voorkomen van ongewenste groei van micro-organismen op oppervlakken.

Een werkwijze volgens de onderhavige uitvinding voorziet onder andere in de mogelijkheid om het effect van antibiotica op micro-organismen te bepalen waardoor het mogelijk wordt om een screeningsassay voor antibiotica op te zetten of het effect van bepaalde behandelingsprocessen op de vorming van bijvoorbeeld biofilms te evalueren en waarnodig te

verbeteren. Ook fermentatieprocessen en bioconversieprocessen kunnen op deze wijze gecontroleerd en verbeterd worden.

Tevens kunnen omgevingscondities, zoals het voorkomen van chemische stoffen in een milieu of omgeving, door het bepalen van een  
5 specifieke prikkel-geïnduceerde verandering in de samenstelling van een of meer micro-organismen, middels een werkwijze volgens de onderhavige uitvinding bepaald worden.

Micro-organismen die in een werkwijze volgens de onderhavige uitvinding toegepast kunnen worden zijn onder andere bacteriën, archaea,  
10 schimmels, gisten, protozoën en algen. Bij voorkeur worden bacteriën, gisten en/of schimmels toegepast in een werkwijze volgens de uitvinding.

De micro-organismen kunnen in de vorm van een reiculture of monoculture van één enkel micro-organisme worden toegepast, maar het is eveneens geschikt om mengsels van micro-organismen, waaronder  
15 natuurlijke gemengde populaties en kunstmatig samengestelde mengpopulaties, toe te passen in uitvoeringsvormen volgens de onderhavige uitvoering. Tevens is het mogelijk om monocultures of mengpopulaties van nature of procesmatig voorkomend in één omgevingsconditie toe te passen in een geheel ander omgevingsconditie.

20 Bij het controleren van processen waarbij specifieke micro-organismen een rol spelen zullen bij voorkeur de specifieke micro-organismen uit die processen worden toegepast in een werkwijze volgens de uitvinding.

Indien een proces plaatsvindt in de afwezigheid van micro-  
25 organismen, kunnen micro-organismen kortere of langere tijd aan de procescondities worden blootgesteld, bijvoorbeeld door deze bij voorkeur vanaf het begin van het proces in de procesruimte te brengen, of door (een gedeelte van) de procesmaterie buiten de procesruimte in contact te brengen met een micro-organisme.

Zonodig kunnen de micro-organismen vooraf worden opgekweekt. Het geniet in bepaalde uitvoeringsvormen de voorkeur om de micro-organismen in een geüniformeerde of gestandaardiseerde of gedefinieerde fysiologische toestand toe te passen. Dit kan bijvoorbeeld het geval zijn

5 indien de micro-organismen buiten de procesruimte worden blootgesteld aan de procescondities, bijvoorbeeld door hen bloot te stellen aan (een gedeelte van) de procesmaterie zoals een mogelijk antibioticum of monsters van water, lucht, voedsel, of wanneer micro-organismen kortere of langere tijd aan bepaalde procescondities worden blootgesteld met het doel de

10 verandering van het micro-organismen te bepalen. Het opkweken van de micro-organismen tot een geüniformeerde of gestandaardiseerde of gedefinieerde fysiologische toestand is in de hier bedoelde gevallen toepasbaar.

Met een geüniformeerde of gestandaardiseerde of gedefinieerde

15 fysiologische toestand wordt in dit verband een toestand van het micro-organisme bedoeld die een bekende biochemische compositie verschaft. Indien een dergelijke biochemische compositie bij herhaling verkregen kan worden kan deze als standaard worden beschouwd.

Het is echter niet noodzakelijk dat de micro-organismen in een

20 geüniformeerde of gestandaardiseerde of gedefinieerde fysiologische toestand worden toegepast. In feite is het meten van een verandering in de biochemische compositie van micro-organismen die worden toegepast in een werkwijze volgens de onderhavige uitvinding voldoende om de condities van de omgeving of veranderingen daarin te bepalen, zolang deze verandering in

25 de biochemische compositie van genoemd micro-organismen gerelateerd kan worden aan een specifieke omgevingsconditie.

Een werkwijze volgens de uitvinding omvat in een voorkeursuitvoeringsvorm een vergelijking tussen tenminste twee omgevingscondities, te weten, een standaard conditie en een experimentele

30 conditie als gevolg waarvan de waargenomen verandering in een



biochemische compositie van een micro-organisme in hoofdzaak relatief van karakter zal zijn.

Met een biochemische compositie van micro-organismen wordt in het onderhavige verband een verzameling van meetresultaten bedoeld die  
 5 het gevolg zijn van metingen aan biomoleculen van micro-organismen die worden toegepast in een werkwijze volgens de onderhavige uitvinding.

Bij voorkeur zijn bedoelde metingen aan biomoleculen kwalitatief, maar ook (semi)kwantitatieve metingen kunnen worden toegepast.

Een geschikte verzameling van meetresultaten wordt gevormd door  
 10 het transcriptioneel expressieprofiel van een micro-organisme dat kan worden verkregen door de verschillende in de cel aanwezige messenger RNA moleculen te meten (transcriptoom). Een alternatieve verzameling van meetresultaten wordt gevormd door het eiwitexpressieprofiel van een micro-organisme voor de verkrijging waarvan de verschillende in de cel aanwezige  
 15 eiwitmoleculen worden gemeten (proteoom). Een ander alternatief is het meten van de verzameling metabolieten (metaboloom).

De biochemische compositie van een micro-organisme, die de biologische toestand of status van een cel weerspiegelt, kan dus zeer geschikt gemeten worden aan de hand van de transcriptionele status,  
 20 waarbij RNA hoeveelheden worden bepaald, de translationele status, waarbij eiwit hoeveelheden worden bepaald, de activiteitsstatus, waarbij enzymactiviteiten worden bepaald, of de status van metabole routes, waarbij metaboliet hoeveelheden worden bepaald, of door bepaling van combinaties daarvan. In feite kunnen metingen aan vele verschillende  
 25 biomoleculen een biochemische compositie van micro-organismen verschaffen die kan worden toegepast in uitvoeringsvormen volgens de onderhavige uitvinding.

Dergelijke biomoleculen kunnen polynucleotiden zoals nucleïnezuren, (poly)peptiden of eiwitten, polysacchariden, lipiden,  
 30 lipopolysacchariden en andere cellulaire macromoleculen omvatten. Ook

kunnen in dit verband metabole intermediären zoals suikers, organische zuren, alcoholen, vetzuren, aminozuren, nucleotiden, en dergelijk worden gemeten. Zeer geschikt kunnen in uitvoeringsvormen volgens de onderhavige uitvinding nucleïne-zuren worden gemeten, zoals RNA, waaronder messenger, transfer en ribosomaal RNA of combinaties daarvan.

Bij grote voorkeur wordt in de onderhavige uitvinding de biochemische compositie van een micro-organisme bepaald door bepaling van de transcriptionele status van de cel, i.e. gemeten in de vorm van messenger RNA.

Metingen aan biomoleculen van micro-organismen die gebruikt kunnen worden voor het opstellen van een verzameling van meetresultaten die gezamenlijk een biochemische compositie verschaffen die kan worden toegepast in uitvoeringsvormen volgens de onderhavige uitvinding hebben bij voorkeur het karakter van een parallelle biochemische analysemethode.

Dergelijke metingen kunnen bijvoorbeeld uitgevoerd worden door de cellulaire biomoleculen van micro-organismen die worden toegepast volgens de uitvinding te scheiden, collectief of afzonderlijk te merken en kwalitatief of kwantitatief te detecteren. Met het scheiden van biomoleculen wordt in dit verband het ruimtelijk afscheiden van groepen van identieke biomoleculen op basis van hun specifieke biochemische eigenschappen bedoeld met het doel een aldus afgescheiden hoeveelheid identieke biomoleculen te kunnen detecteren en zonodig kwantificeren. Ruimtelijk scheiden van verschillende groepen van identieke biomoleculen is echter niet altijd noodzakelijk. Met het merken van biomoleculen wordt in dit verband bedoeld het specifiek of a-specifiek markeren van biomoleculen met specifiek merkers met het doel de aldus gemarkeerde biomoleculen te detecteren en zonodig te kwantificeren.

Hiertoe kan gebruik worden gemaakt van één of meer technieken zoals:

- *in situ* meettechnieken zoals nucleïnezuur probe technieken en/of immunologische meettechnieken; hierbij kunnen verschillende cellulaire bestanddelen afzonderlijk worden gemeten, zonder dat feitelijke scheiding daarvan plaatsvindt, door gebruik te maken van specifieke of a-specifieke detectietechnieken, waarvan de geschiktheid afhankelijk is van het te detecteren bestanddeel;

- elektroforetische en/of chromatografische meettechnieken; hierbij kunnen de cellulaire bestanddelen worden gescheiden op basis van o.a. grootte, gewicht, lading, gevoeligheid voor denaturatie, waarna detectie plaatsvindt met behulp van specifieke of a-specifieke detectietechnieken, waarvan de toepassing afhankelijk is van het te detecteren bestanddeel;

- micro array en/of biochip technieken; hierbij worden biochemische bestanddelen gescheiden op basis van affiniteit voor een op een drager geïmmobiliseerde bindingspartner en vindt detectie plaats vindt met behulp van specifieke of a-specifieke detectietechnieken waarvan de geschiktheid afhankelijk is van het te detecteren bestanddeel.

Geschikte detectietechnieken die in verband met bovenstaande technieken kunnen worden toegepast zijn onder andere autoradiografische detectietechnieken, op fluorescentie, luminescentie of fosforescentie gebaseerde detectietechnieken en chromogene detectietechnieken. Deze technieken zijn in het vakgebied van de detectie van biomoleculen bekend.

Bij voorkeur wordt in de onderhavige uitvinding de transcriptionele status van een micro-organisme gemeten door gebruik te maken van technieken waarbij wordt gehybridiseerd aan arrays van nucleïnezuur probes of nucleïnezuur imiterende probes.

Om een transcriptionele status van een micro-organisme te bepalen kan het RNA, zowel het totaal RNA als het mRNA, geïsoleerd worden uit één of meer cellen van genoemd micro-organisme. Iedere RNA isolatie methode die niet selecteert tegen de isolatie van mRNA kan toegepast worden bij de isolatie van dergelijk RNA (zie bijvoorbeeld Ausubel *et al.*,

1987-1993, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. New York). Voorts kunnen grote hoeveelheden monsters behandeld worden door gebruik te maken van werkwijzen die bij de vakman bekend zijn, zoals bijvoorbeeld het enkel-staps isolatie-proces van Chomczynski (1989, U.S.

5 Pat. No. 4,843,155).

Transcripten (de RNA-afschriften van DNA) vertegenwoordigen RNA van differentieel tot expressie gebrachte genen, en kunnen in de verschillende RNA monsters worden geïdentificeerd door gebruik te maken van een verscheidenheid aan werkwijzen die bij de vakman bekend zijn.

10 Hiertoe kan onder andere gebruik worden gemaakt van "differential screening" (Tedder *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:208-212), "subtractive hybridization" (Hedrick *et al.*, 1984, Nature 308:149-153; Lee *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2825), "differential display" (Liang & Pardee, 1992, Science 257:967-971; U.S. Pat. No. 5,262,311) "expressed  
15 sequence tag (EST)" (Adams *et al.*, 1991, Science 52:1656) or "serial analysis of gene expression (SAGE)" (Kinzler *et al.*, U.S. Pat. No. 5,695,937) of cDNA AFLP (Vos *et al.*, 1995, Nucleic Acids Res., 23, 4407-14) technieken.

De identificatie van dergelijke differentieel tot expressie gebrachte genen kan verder toegepast worden om specifieke merkers te ontwerpen  
20 waarmee versneld een specifieke omgevingsconditie van een micro-organisme bepaald kan worden.

Voor het meten van de verschillende mRNA moleculen in een micro-organisme wordt het mRNA bij voorkeur eerst omgezet in complementair DNA (cDNA), waartoe bij de vakman bekende werkwijzen  
25 beschikbaar zijn, zoals reverse transcriptie van het mRNA in cDNA met behulp van het enzym reverse transcriptase. Eventueel kan de omzetting van RNA in cDNA worden gecombineerd met een amplificatie van het cDNA middels PCR (Mullis 1987, U.S. Pat. No. 4,683,195, 4,683,202, en 4,800,159)  
- optioneel in een zgn. "nested", "multiplex" of "a-symmetrische" uitvoering -  
30 of met behulp van een "ligase chain reaction" (Barany 1991, Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 88:189-193; EP Application No., 320,308), een "self sustained sequence replication (3SR)" (Guatelli *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878), een "strand displacement amplification (SDA)" (U.S. Pat. Nos. 5,270,184, en 5,455,166), een "transcriptional amplification system" (Kwoh *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177), een "Q-Beta Replicase" (Lizardi *et al.*, 1988, Bio/Technology 6:1197), "Rolling Circle Amplification" (RCA) of een andere werkwijze voor de amplificatie van nucleïnezuuren. In een alternatieve werkwijze kan het RNA ook direct worden toegepast of eerst worden geamplificeerd middels daartoe beschikbare RNA amplificatie methoden als "Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA)" (L. Malek *et al.*, 1994, Meth. Molec. Biol. 28, Ch. 36, Isaac PG, ed., Humana Press, Inc., Totowa, N.J.) of middels TMA.

Werkwijzen voor het verkrijgen van genetische informatie door toepassing van een nucleïnezuur array zijn bij de vakman bekend (zie o.a.

Chee *et al.*, 1996, Science 274(5287):610-614)

In een werkwijze volgens de onderhavige uitvinding verdient toepassing van een DNA array de voorkeur. Dergelijke arrays van oligonucleotides omvatten sequenties die specifiek zijn voor de genetische merkers, en vormen tevens onderdeel van de onderhavige uitvinding.

De vervaardiging van een oligonucleotide array volgens de uitvinding kan worden uitgevoerd met behulp van werkwijzen die bij de vakman bekend zijn. De vervaardiging en het gebruik van vaste drager nucleïnezuur arrays voor de detectie van specifieke nucleïnezuursequenties is veelvuldig beschreven (US 5,571,639; Sapolsky *et al.*, 1999, Genet. Anal.-Biomolecular Eng. 14, 187-192; Shena *et al.*, 1995, Science 270, 467-470; Sheldon *et al.*, 1993, Clinical Chem. 39, 718-719; Fodor *et al.*, 1991, Science 251, 767-773).

De vakman zal in staat zijn om arrays naar eigen ontwerp en daarbij behorende array uitleesapparatuur te verkrijgen bij daarin gespecialiseerde toeleveranciers (bijvoorbeeld Affymetrix Corp., Santa

Clara, CA, USA voor DNA arrays en CIPHERGEN Biosystems, Fremont, CA, USA voor ProteinChip Array).

Het bepalen van een omgevingsconditie door het meten van een biochemische compositie van één of meer micro-organismen blootgesteld aan genoemde omgevingsconditie kan als een enkelvoudige meting worden  
5 uitgevoerd. Ook kan de biochemische compositie van micro-organismen worden gemeten bij blootstelling aan een meervoudigheid van omgevingscondities waarbij één bepaalde, gedefinieerde omgevingsparameter op verschillende waarden wordt ingesteld. Op deze  
10 wijze kunnen specifieke veranderingen in de biochemische compositie van die micro-organismen als gevolg van deze veranderende omgevingsparameter worden bepaald.

Bij meting van de biochemische compositie van micro-organismen blootgesteld aan een meervoudigheid van bekende omgevingscondities  
15 waarbij één bepaalde, gedefinieerde omgevingsparameter op verschillende waarden wordt ingesteld is het mogelijk om ijk-metingen te verkrijgen aan de hand waarvan een virtuele ijklijn opgesteld kan worden, waarbij één van de variabelen wordt gevormd door de verschillende waarden waarop een omgevingsparameter is ingesteld, en waarbij een andere variabele wordt  
20 gevormd door de veranderende biochemische compositie van micro-organismen.

Op dergelijke metingen kunnen verschillende analysetechnieken worden betrokken, zoals een statistische analyse, bijvoorbeeld een multivariantie analyse, of andere analysetechnieken zoals die thans bestaan of zoals die  
25 ontwikkeld kunnen worden voor toepassing in een uitvoeringsvorm volgens de uitvinding. In een werkwijze volgens de onderhavige uitvinding verdient toepassing van analyse methoden als "self-organising maps", hierarchische clustering, "multidimensional scaling", principale component analyse, "supervised learning", "k-nearest neighbours", "support vector machines",  
30 discriminant analyse en "partial least square" methoden de voorkeur. De

genoemde analyse op de verzameling van meetresultaten die gezamenlijk een verandering in de biochemische compositie van micro-organismen als gevolg van veranderende, gedefinieerde omgevingscondities beschrijven, levert een waarde op voor de omgevingsparameter en daarmee voor de  
5 omgevingsconditie.

Bij het bepalen van een onbekende omgevingsconditie middels een werkwijze volgens de uitvinding geniet de het voorkeur om bedoelde ijk-metingen in een stadium voorafgaand aan de bepaling van de onbekende omgevingsconditie uit te voeren. De gemeten biochemische compositie van  
10 één of meer micro-organismen die zijn blootgesteld aan de onbekende omgevingsconditie levert vervolgens aan de hand van de positie van genoemde biochemische compositie op genoemde ijklijn een waarde voor die omgevingsconditie.

Een ijklijn zoals toegepast in uitvoeringsvormen volgens de  
15 onderhavige uitvinding behoeft niet noodzakelijkerwijs als een absolute ijklijn te worden bechouwd. Ook een virtuele ijklijn vindt geschikte toepassing in de uitvinding. De combinatie van bijvoorbeeld verschillende genexpressieniveau's kunnen eenvoudig als resultaten in een database worden opgeslagen, waardoor de uitkomst van een meting met resultaten  
20 van voorgaande metingen vergeleken kan worden. Deze virtuele ijklijn of database zal daarmee in omvang en detail toenemen waardoor resultaten steeds beter onderbouwd worden op basis van steeds meer nieuwe resultaten.

## CONCLUSIES

1.        Werkwijze voor het bepalen van een omgevingsconditie door het meten van een biochemische compositie van één of meer micro-organismen die zijn blootgesteld aan genoemde omgevingsconditie.
2.        Werkwijze voor het bepalen van veranderingen in een  
5    omgevingsconditie door het meten van veranderingen in een biochemische compositie van één of meer micro-organismen die zijn blootgesteld aan genoemde veranderingen in een omgevingsconditie.
3.        Werkwijze voor het bepalen van een omgevingsconditie omvattende het meten van een biochemische compositie van één of meer micro-  
10    organismen die zijn blootgesteld aan genoemde omgevingsconditie, het afzetten van genoemde biochemische compositie tegen een tevoren bepaalde ijklijn van een meervoudigheid van biochemische composities van genoemde één of meer micro-organismen verkregen middels blootstelling van  
15    genoemde één of meer micro-organismen aan een meervoudigheid van omgevingscondities en het bepalen van genoemde omgevingsconditie aan de hand van de positie van genoemde biochemische compositie op genoemde ijklijn.
4.        Werkwijze volgens één van de conclusies 1-3, waarin genoemde één of meer micro-organismen bacteriën, schimmels en/of gisten omvatten.
- 20    5.        Werkwijze volgens één van de voorgaande conclusies, waarin genoemde biochemische compositie het transcriptoom, het proteoom en/of het metabooloom van een micro-organisme omvat.
6.        Werkwijze volgens één van de voorgaande conclusies, waarin genoemde biochemische compositie het transcriptoom is.
- 25    7.        Werkwijze volgens conclusie 5 of 6, waarin genoemde biochemische compositie wordt bepaald met behulp van micro-arrays.



8.        Werkwijze voor het controleren of monitoren van een  
omgevingsconditie, omvattende een werkwijze volgens één van de conclusies  
1-7.
9.        Werkwijze voor het controleren van een proces, omvattende een  
5        werkwijze volgens conclusie 8.
10.       Gebruik van een werkwijze volgens één van de conclusies 1-9,  
waarin een omgevingsconditie van een voedselbereidingsproces, een  
biofilmvormingsproces, een fermentatieproces en/of een bioconversieproces  
wordt bepaald.
- 10       11.       Gebruik van een werkwijze volgens één van de conclusies 1-9, voor  
het bepalen van een chemische en/of biologische stof in lucht en/of waterig  
milieu.